

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

17.9.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 9月30日
Date of Application:

RECD 04 NOV 2004

出願番号 特願2003-342222
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-342222]

WIPO PCT

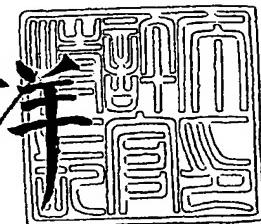
出願人 三井化学株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0002577
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 和田 光史
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 及川 利洋
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 望月 大資
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 徳田 淳子
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 川嶋 美由貴
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 安楽城 正
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 阿部 玲子
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 三宅 仁基
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1144 三井化学株式会社内
 【氏名】 高橋 均
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1111番地 東レ株式会社内
 【氏名】 澤井 秀樹
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1111番地 東レ株式会社内
 【氏名】 耳塚 孝
【特許出願人】
 【識別番号】 000005887
 【氏名又は名称】 三井化学株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100123788
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 宮崎 昭夫
 【電話番号】 03-3585-1882
【選任した代理人】
 【識別番号】 100088328
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 金田 暢之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 201087

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項1】**

ピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) 活性が野生型より低下しているか全くなくなっているヘテロ乳酸発酵細菌、または、ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 及びピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性が野生型より低下しているか全くなくなっているヘテロ乳酸発酵細菌を培養し、得られた培養物から乳酸を回収することを特徴とする、乳酸の生産方法。

【請求項2】

ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 及び／またはピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性が野生型より低下しているか全くなくなっているヘテロ乳酸発酵細菌を2種以上のアミノ酸が添加された培地で培養し、得られた培養物から乳酸を回収することを特徴とする、乳酸の生産方法。

【請求項3】

ヘテロ乳酸発酵細菌が大腸菌であることを特徴とする請求項1～2に記載の乳酸の生産方法。

【請求項4】

大腸菌がMT-10934 (FERM P-19092) 株であることを特徴とする請求項3に記載の乳酸の生産方法。

【請求項5】

通気条件下で培養することを特徴とする請求項1～4の何れか一項に記載の乳酸の生産方法。

【請求項6】

通気条件が温度30℃の水を対象とした場合常圧で酸素移動容量係数 $k_{L a}$ が 1 h^{-1} 以上 400 h^{-1} 以下となるような条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件であることを特徴とする請求項5に記載の乳酸の生産方法。

【請求項7】

培養pHが6～8であることを特徴とする請求項1～6の何れか一項に記載の乳酸の生産方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】乳酸を高生産する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は光学的に極めて純度が高い乳酸を効率良く生産する方法に関する

【背景技術】

【0002】

生分解性ポリマーであるポリ乳酸は、CO₂問題・エネルギー問題の顕在化とともにサステイナビリティー（持続可能性）、LCA（ライフサイクルアセスメント）対応型製品として強い注目を浴びており、その原料である乳酸には効率的で安価な製造法が求められている。

【0003】

ちなみに現在生産されているポリ乳酸はL-乳酸ポリマーであるが、乳酸にはL-乳酸（以下、L体と略することがある）とD-乳酸（以下、D体と略することがある）があり、D体についてもポリマー原料や農薬、医薬の中間体として近年注目が集まりつつある。但しいずれの用途においても、原料たるL体、D体には高い光学純度が要求されるのが事実である。

【0004】

自然界には乳酸菌や糸状菌など乳酸を効率良く生産する微生物が存在し、それらを用いた乳酸製造法の中には既に実用化されているものもある。例えば、L体を効率良く生産させる微生物として*Lactobacillus delbrueckii*などがあり、D体を効率良く生産させる微生物として*Sporolactobacillus*属の微生物などが知られている。いずれの場合も乳酸の蓄積量は高いレベルに達しているが、培養液中に含まれる乳酸以外の副生物、例えば酢酸、エタノール、アセトイン、ピルビン酸といった化合物が精製過程で除けずに、最終産物である乳酸の品質低下につながることがある。また光学異性体の混入が原因で、光学純度の低下をきたす事も重大な問題となる。

【0005】

そのような乳酸の純度低下を回避するには、微生物によって生産される副生物の量を低減化させることができが最も効果的である。近年発展してきた遺伝子組換え技術を利用して微生物の特定遺伝子を破壊すれば、狙った副生物の生産を特異的に阻害することが可能となってきた。ただ現状的には、遺伝子破壊法がどのような微生物にでも容易に適用できる訳ではなく、乳酸菌や糸状菌など元来乳酸を高生産できる微生物での適用は困難である。なぜならこれらの微生物はゲノム情報が必ずしも十分とは言えず、遺伝子組換えの宿主としても汎用されていないからである。

【0006】

それに対しゲノム情報が豊富で、遺伝子組換え宿主としての実績が十分にある大腸菌、酵母、ヒト培養細胞等では、乳酸菌や糸状菌などよりも比較的容易に遺伝子破壊を行うことが可能である。特に発酵によって乳酸を生産させる場合には、増殖の速さや培養の容易さの点から大腸菌が最も好ましく、すでに組換え大腸菌を用いた乳酸生産に関する成果が幾つか報告されている。Changら [Chang, D-E., Appl Environ Microbiol 65 1384-9 (1999)] は、大腸菌のホスフォトランスアセチラーゼ（以下ptaと略することがある）、及びホスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下ppcと略することがある）の2重破壊変異株を5%のグルコース、及びアミノ酸を含む培地を用い、予め通気培養で菌体を増加させた後、嫌気培養を行い、培地中のグルコースが5%を超えないようにグルコースを追添加し培養することにより、62.2 g/LのD-乳酸を60時間で生産することに成功した。このときのグルコースのD-乳酸への転換率は76%を達成している。また少ない通気量で通気を継続し培養した場合は72時間で同レベルの乳酸を生産している。また終始嫌気培養した場合は、約50 g/LのD-乳酸を生産するために150時間もの時間がかかることが開示されている。

【0007】

Zhouら [Zhou, S., Appl Environ Microbiol 69:399-407(2003)] は、ピルベートホルメートリアーゼB (pf1B) 、フマル酸レダクターゼABCD (frdABCD) (以下frdと略すことがある) 、アルコール/アルデヒドデヒドロゲナーゼ(以下adeEと略すことがある) 、およびアセテートキナーゼ(以下ackAと略すことがある) の4重破壊大腸菌を作製し、これを5%のグルコースを含む無機塩培地で嫌気条件下にて168時間培養することによって、48.5g/LのD-乳酸が生産されると報告している。また、Zhouらはpf1B、frd、adeEの3重破壊変異株を用いて5%のグルコース、及び無機塩を含む培地を使用し、培養初期に溶存酸素濃度を20%に維持するよう8時間通気し、その後嫌気的に培養することにより120時間で約50g/Lを達成している。これらの生産方法でZhouらが強調している点は、グルコースからD-乳酸への転換率が高く、培地中のコハク酸、蟻酸、酢酸、エタノールといった副生物量が顕著に低減化されており、光学純度も99%以上と非常に高いということである。しかしその反面、D-乳酸蓄積量が50g/Lと低く、培養生産にかかる時間も120時間以上と非常に長いため、工業化生産を考えた場合には蓄積量をさらに向上させ、培養時間をさらに短縮する必要がある。しかし、彼らはその点についてはまったく言及していない。

【0008】

蓄積量を向上させるためには培養液により多くのグルコースを添加し培養すれば良いが、一般にグルコースの添加量を増加させるとD-乳酸への転換率の低下が観察される。したがってZhouらのように5%程度の低いグルコース濃度で培養して高い転換率が観察されても、それが直ちに高い蓄積量につながるものではない。またZhouらは不純物低減の観点から無機塩培地を用いているが、この培地は大腸菌の生育にとって最低限必要な栄養素しか含んでおらず、該培地を用いる限りにおいては、彼らが生産時間として開示した120時間を顕著に短縮させることは困難である。

【0009】

先にも述べたが大腸菌で乳酸を生産させた場合に、開示されている最大乳酸蓄積量はChangらによる62.2g/Lであり、生産時間が60時間であった。現在L-乳酸の工業化生産に用いられている乳酸菌または糸状菌のL-乳酸生産性は、乳酸蓄積量100g/L以上かつ生産時間24時間以内であることを考慮すれば、従来の大腸菌による乳酸蓄積量と生産時間は、工業化を想定した場合に満足できるレベルにあるとは言えない。しかも、大腸菌において乳酸菌または糸状菌なみの乳酸生産性を達成したという報告は過去になく、それどころかそもそも大腸菌を用いて100g/Lを越える乳酸を蓄積生産させることができるのか否かについても、それを示唆するようなデータは過去に存在しなかった。

【0010】

pf1破壊株を用いた乳酸生産に関してはZhouらの報告に先立ち、以下のような報告がなされている。すなわちContagら [Contag, PR., Appl Environ Microbiol 56:3760-5(1990)] は、pf1の非変異株が35mMの乳酸を生成し、pf1の変異株により乳酸の生産性は向上し45mMの乳酸を生成することを示している。すなわち、大腸菌においてpf1の破壊により乳酸の生産性が向上することはContagらのデータ開示により公知となっている。

【0011】

一方、ピルベートデヒドロゲナーゼ(以下pdhと略することがある)の変異株についてはChangら [Chang, YY., J. Bacteriol. 154:756(1983)] により取得されている。また、Changらは、pf1、及びpdhの両遺伝子の変異株も取得している。しかしながらこれらの菌体の乳酸生産についての詳細はこれまで明らかではなかった。

【0012】

以上をまとめると、pf1破壊によって乳酸生産性が向上することは公知であった。一方、pdhの破壊株は取得されてはいたが、pdh破壊によって乳酸生産性がどのように変化するかについてその詳細は明らかではなかった。

【非特許文献1】 Chang D-E, Appl Environ Microbiol 65(4):1384-9(1999)

- 【非特許文献2】Shengde Z., Appl Environ Microbiol 69(1) 399-407(2003)
 【非特許文献3】Pamela R. C., Appl Environ Microbiol 56(12):3760-5(1990)
 【非特許文献4】Chang YY, J. Bacteriol. 154:756(1983)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の課題の一つは、ヘテロ乳酸醸酵細菌を用いて乳酸を効率的に生産する乳酸の生産方法を提供することである。本発明の別な課題は、ヘテロ乳酸醸酵細菌を用いて光学純度の高い乳酸を効率的に生産する乳酸の生産方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明者らは、これら上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1)、または／及びピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性を低下、若しくは消失させたヘテロ乳酸醸酵細菌が、従来の方法に比較してより短時間に乳酸を生産し、さらにこれまでになく高い蓄積量を達成することを見いだし本発明に到達した。

【0015】

すなわち本発明は以下のとおりである。

[1] ピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) 活性が野生型より低下しているか全くなっているヘテロ乳酸発酵細菌、または、ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 及びピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性が野生型より低下しているか全くなっているヘテロ乳酸発酵細菌を培養し、得られた培養物から乳酸を回収することを特徴とする、乳酸の生産方法。

[2] ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 及び／またはピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性が野生型より低下しているか全くなっているヘテロ乳酸発酵細菌を2種以上のアミノ酸が添加された培養液で培養し、得られた培養物から乳酸を回収することを特徴とする、乳酸の生産方法。

[3] ヘテロ乳酸発酵細菌が大腸菌であることを特徴とする [1] ~ [2] に記載の乳酸の生産方法。

[4] 大腸菌がMT-10934 (FERM P-19092) 株であることを特徴とする [3] に記載の乳酸の生産方法。

[5] 通気条件下で培養することを特徴とする [1] ~ [4] の何れか一項に記載の乳酸の生産方法。

[6] 通気条件が温度30℃の水を対象とした場合常圧で酸素移動容量係数 $k_{L a}$ が 1 h^{-1} 以上 200 h^{-1} 以下となるような条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件であることを特徴とする [5] に記載の乳酸の生産方法。

[7] 培養pHが6.0~8.0であることを特徴とする [1] ~ [6] の何れか一項に記載の乳酸の生産方法。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、p f 1活性又はp d h活性が野生型より低下しているか全くなっているヘテロ乳酸発酵細菌を用いて乳酸を生産することにより既存の方法に比較してより効率よく経済的に乳酸を生産することが可能となる。また、p f 1活性及びp d h活性が野生型より低下しているか全くなっているヘテロ乳酸発酵細菌を用いて乳酸を生産することにより不純物のより少ない高純度の乳酸を効率よく生産することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明においてピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) 活性とは、ピルビン酸より二酸化炭素とアセチルCoAを生成する酵素活性であり、該酵素活性が野生型より低下していることは突然変異及び／または遺伝子組み換えにより、それらの処理を行う前の状態と比較

して、例えば処理前の親株あるいは宿主と比較して、有意に活性が低下している状態を指し、全くくなっているとは、既存の p d h 活性測定系を用いて測定された活性が検出限界以下である状態を指す。

【0018】

本発明におけるヘテロ乳酸発酵細菌とは、糖を発酵的に分解して乳酸以外にギ酸、酢酸、コハク酸及びエタノールより選ばれる化合物のうち少なくとも1種類を生産する能力をもつ細菌を意味する。

【0019】

本発明において、ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 活性とは、ピルビン酸よりギ酸とアセチル C o A を生成する酵素活性であり、該酵素活性が野生型より低下しているとは突然変異及び／または遺伝子組み換えにより、それらの処理を行う前の状態と比較して、例えば処理前の親株あるいは宿主と比較して、有意に活性が低下している状態を指し、全くくなっているとは、既存の p f 1 活性測定系を用いて測定された活性が検出限界である状態を指す。なお、ピルベートホルメートリアーゼは、p f 1 A 遺伝子と p f 1 B 遺伝子の2つの遺伝子の産物により構成されている。両者を区別する必要がない場合は単に p f 1 と記載し、p f 1 B 遺伝子のみを指す場合は p f 1 B と記載する。

【0020】

ピルベートデヒドロゲナーゼおよび／またはピルベートホルメートリアーゼを破壊されたヘテロ乳酸醣酵細菌は、この細菌に対する遺伝子組み換え系が開発されていてこれらの遺伝子が同定されているヘテロ乳酸醣酵細菌において遺伝子組み換え技術を用いて p d h および／または p f 1 を破壊することにより作成することができる。また、上記の遺伝子に関する情報についての条件が満たされない菌体でも UV 変異処理や変異剤処理を適当な条件で行い p d h および／または p f 1 活性が低下した菌株を作出することができる。

【0021】

さらに具体的には本発明のヘテロ乳酸醣酵細菌としては大腸菌が好適であり、ピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) 活性が野生型より低下しているか全くくなっているヘテロ乳酸発酵細菌としては大腸菌 W 1 4 8 5 1 i p 2 株 (ATCC 25645) 株や大腸菌 MT - 1 0 9 3 4 株、または p d h を本発明の実施例の方法などにより破壊した菌株などが例示できる。また、ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 及びピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性が野生型より低下しているか全くくなっているヘテロ乳酸発酵細菌としては大腸菌 MT - 1 0 9 3 4 株や任意の大腸菌野生株の p f 1 遺伝子および p d h を破壊した菌株が例示できる。さらにピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) の活性を低下、若しくは消失したヘテロ乳酸醣酵細菌としては本発明の実施例で示した方法などで作成できる任意の大腸菌野生株の p f 1 B 遺伝子の破壊株や、大腸菌 MT - 1 0 9 3 4 株が例示できる。

【0022】

MT - 1 0 9 3 4 はすでにピルベートデヒドロゲナーゼがトランスポゾンを用いた変異で完全破壊され、ピルベートホルメートリアーゼは変異剤によりその活性が低下しているため、この株を用いて容易に本発明を実施することが可能である。本菌株は、寄託番号 F E R M P - 1 9 0 9 2 として、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号中央第 6 の、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに平成 14 年 11 月 8 日より寄託されている。

【0023】

また、p d h、もしくは p f 1 の単独変異株は、MT - 1 0 9 3 4 株には H f r C の性質があるため任意の F - の性質をもつ野生株、例えば MG 1 6 5 5 株、W 3 1 1 0 株 (ATCC 39936) などと LB 培地中で 2 時間混合後、希釀してシングルコロニーを取得し、所望の変異株を選択すればよい。p d h 変異株は好気培養で増殖が野生株と比較して遅く、p f 1 変異株は嫌気培養において、野生株と比較してギ酸の生成量が低下しているのでそれらを指標に選択することでも取得できる。

【0024】

本発明における乳酸生産のための培養とは、培地を用いてヘテロ乳酸醸酵細菌を培養することである。その際、使用される培地としては乳酸を生産するために必要な栄養源を含む培地であれば特に制限されない。このような栄養源としては、炭素源、窒素源、無機イオン、菌体が要求する有機微量元素、核酸及びビタミン類等が挙げられ、これらから適宜選択されたものを利用して培地を調製することができる。グルコースを培地に添加する場合は、5質量%以上で20質量%程度までが好ましく、6質量%から15質量%がより好ましい。

【0025】

本発明において培地に添加してもよい2種以上のアミノ酸とは、天然に存在する各種アミノ酸の少なくとも2種の組合せ、あるいは酵母エキス、カザミノ酸、ペプトン、ホエー、廃糖蜜、コーンスティーブリカーなどの複数のアミノ酸を混合物として含有する天然物や天然物抽出物の加水分解物を指す。より好ましい結果を得るために酵母エキス、ペプトン、ホエー、廃糖蜜、コーンスティーブリカーより選ばれる少なくとも1種類、もしくはそれらの2種以上が0.5質量%から20質量%含む培地が好ましく、2質量%から15質量%ではさらに好ましい。特にコーンスティーブリカー添加は大きな効果が得られ、このとき硫酸アンモニウムなどの塩は添加しないほうがむしろよい結果となる。培地は通常液体培地である。

【0026】

本発明における乳酸生産株の培養条件としては菌の種類、培養装置などにより変動するが、例えばp_f1活性が低下しているMT-10934株を使用する場合は、培養温度は20℃から40℃、より好ましくは25℃から35℃で培養することが好ましく、pHはNaOH、NH₃等で6.0から7.2、より好ましくは6.5から6.9で調整し、培養することが好ましい。培養時間は得に限定されないが、菌体が十分に増殖し、且つ乳酸が生成するに必要な時間である。

【0027】

また、p_f1活性を消失させた大腸菌野生株であるMG1655株のp_f1B遺伝子破壊株を用いた場合には、中性もしくは中性よりややアルカリ性側のpHで最大の生産性が得られ、培養pHは6.9から7.4、より好ましくは7.1から7.3である。MG1655株由来p_f1破壊株はMT-10934株におけるより高温で効率よく乳酸生産をすることが可能であり、33℃から42℃で培養することで最大の生産性を得ることができる。

【0028】

培養に際しては通常は温度、pH、通気条件、攪拌速度を制御し得る培養槽を用いるのが一般的であるが、本発明の培養に際しては培養槽を使用することに限定されない。培養槽を用いて培養する場合には、必要により、予め前培養として種培養を行いこれを必要量予め調製しておいた培養槽内の培地に接種してもよい。

【0029】

MT-10934株は、pH7~7.5のpH領域でギ酸が生成することがあるのに対して大腸菌MG1655株のp_f1遺伝子破壊株では、ギ酸の生成は確認されない。よって、ヘテロ乳酸醸酵細菌として大腸菌を用いる場合は、採用した菌体で中性付近のpHの培地を用いて乳酸を生産させた場合に、MT-10934株のようにギ酸の生成が観察されたときは、実際の乳酸の製造に際しては培地のpHを中性よりやや酸性側で制御し、大腸菌MG1655株のp_f1遺伝子破壊株のようにギ酸の生成が観察されない場合は実際の乳酸の製造に際しては培地のpHを中性もしくはややアルカリ性側に制御することで最大生産性が得られる。

【0030】

本発明の培養時の通気条件は、通気を全く行わなくとも乳酸を生産することは可能であるが、より好ましい結果を得るために通気を行った方がよい。ここで言う通気条件下とは必ずしも培養液中を空気が通過する必要はなく、培養槽の形状によっては適度に培養液を攪拌しながら培養液上の空気層が換気されるような上面通気も含み、培養槽の内部に酸素

を含む気体を流入させることを意味する。液中に通気する場合は内圧、攪拌羽根位置、攪拌羽根形状、攪拌速度の組み合わせにより溶存酸素濃度が変化するために乳酸の生産性および乳酸以外の有機酸量などを指標に次のように最適条件を求めることができる。例えば上記大腸菌をA B L E 社製培養装置B M J - 0 1 等の比較的小型の培養槽で培養する場合は、500 g の培養液を使用した際、空気を常圧で0. 0 1 v v m ~ 1 v v m 、攪拌速度は、50 rpm ~ 500 rpm 、より好ましくは、常圧で0. 1 v v m ~ 0. 5 v v m 、攪拌速度100 rpm ~ 400 rpm で達成し得る通気条件で好ましい結果を得ることができる。この条件は通気攪拌条件が温度30℃の水を対象とした場合常圧で酸素移動速度係数k_{L a} が1 h⁻¹ 以上400 h⁻¹ となる条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件である。

【0031】

また、最適な通気条件の別の指標としてはMT-10934株が嫌気培養で生産するギ酸、酢酸、コハク酸、エタノールが5. 0 g / L 以下、さらに好ましくは1. 0 g / L 以下になり且つ、乳酸が生産されるような通気量、攪拌速度により達成される通気条件である。

【0032】

また、最適な通気条件の別の指標としては0. 3 質量% の光学異性体であるL-乳酸を含む培地でMT-10934株を培養した際に10 ~ 100 時間以内にL-乳酸の濃度が0. 0 2 質量% 以下に低下するような通気量、攪拌速度である。

【0033】

上述した通気条件は培養初期から終了まで一貫して行う必要はなく、培養工程の一部で行うことでも好ましい結果を得ることができる。

【0034】

また、上記のように通気を行うことで乳酸の生産性の向上、光学異性体が不要である場合において、不要である光学異性体の削減を達成することができる。

【0035】

本発明における培養物とは、上述した方法により生産された菌体、菌体を含む培養液、菌体が除去されている培養液、及びそれらの処理物を指す。

【0036】

以上のようにして得られた培養液等の培養物から乳酸を回収する方法には、例えば培養液からならば通常知られた方法が利用できる。具体的には、培養物を酸性化した後直接蒸留する方法、乳酸のラクチドを形成させて蒸留する方法、アルコールと触媒を加え乳酸をエステル化した後蒸留する方法、乳酸を有機溶媒中に抽出する方法、イオン交換カラムで乳酸を分離する方法、電気透析により乳酸を濃縮分離する方法などやそれらを組み合わせた方法が採用できる。また、本発明の方法により生産された菌体は、乳酸の生産に適した酵素群を生産していることから、菌体を回収して再利用する方法、別プロセスでリアクター反応に利用する方法、酵素群を回収して反応に用いる方法などにより乳酸を生産し、生産された乳酸を回収することも、培養物から乳酸を回収する工程を有する本発明の製造方法に含まれる。

【実施例】

【0037】

以下に実施例により本発明の一例を示すが、これらは本発明を何ら制限するものではない。なお、特に記載しない限りは「%」は質量基準である。

実施例1 (MT-10934株による乳酸生産)

培養に使用する培地の組成を下記表1に記載する。

【0038】

【表1】

表1：培地組成

ブドウ糖	10%
コーンスティーブリカー（日本食品化工製）	5%
硫酸アンモニウム	0.5%
リン酸水素二ナトリウム12水和物	0.3%
リン酸二水素カリウム	0.15%
塩化ナトリウム	0.15%
硫酸マグネシウム7水和物	0.1%
アデカノールL G 1 2 6	0.1%

(残部；水)

【0039】

本培地にはコーンスティーブリカー由来の酸加水分解後の還元糖0.34%、D-乳酸0.31%、L-乳酸0.31%、遊離アミノ酸0.33%及び微量の各種有機酸が含まれている。

【0040】

前培養として三角フラスコに入れたLB Broth, Miller 培養液(Difco 244620) 25mlに乳酸生産菌MT-10934株を植菌し、一晩120rpmで搅拌培養を行った後、1L容培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に上記組成の培地475gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、搅拌速度150rpm、培養温度31°C、pH 6.7(NaOHで調整)でグルコースが完全に消費されるまで行った。

【0041】

培養終了後、得られた培養液中の有機酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法に従って測定した。結果を表2に示す。

【0042】

【表2】

表2

	MG1655(wild)	MT-10934株
D-乳酸蓄積量	54.9g/kg培溶液	90.5g/kg培養
培養液回収量	540g	570g
乾燥菌体重量	3.5g/L	2.2g/L
D-乳酸光学純度	99.9%ee以上	99.9%ee以上
コハク酸	6.2g/L	N.D <0.2g/L
ギ酸	1.8g/L	N.D <0.1g/L
酢酸	2.4g/L	N.D <0.1g/L
エタノール	0.8g/L	N.D <0.1g/L
培養開始50hr後のD-乳酸蓄積量	46.5g/kg	58.2g/kg

N.D:Not detected (検出されず)

【0043】

上記結果において、総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわっている原因はコーンスティープリカーレー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンスティープリカーレー中の還元糖、有機酸、アミノ酸をすべて使用したとしても90%以上の変換率を達成した。また、培地中に不純物である有機酸や乳酸の光学異性体の含まれる培養液を使用しても不純物である有機酸が減少し、光学純度が高い乳酸が製造された。なお、野生株であるMG1655株はアメリカン・タイプ・カルチャーコレクション(ATCC)よりATCC47076として入手した。

【0044】

実施例2 (乳酸デヒドロゲナーゼ発現ベクターおよび乳酸生産菌の構築)
 実施例2 (乳酸デヒドロゲナーゼ発現ベクターおよび乳酸生産菌の構築)
 セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(serine hydroxymethyltransferase) (g 1 y A) プロモーターを取得するため大腸菌ゲノムDNAをテンプレートに用いて配列番号: 1、及び配列番号: 2をプローブとして用いることによりPCR法で增幅し、得られたフラグメントを制限酵素EcoRIで消化することで約850bpのg 1 y Aプロモーターをコードするフラグメントを得た。さらに乳酸デヒドロゲナーゼ構造遺伝子 (1dhA) を取得するために大腸菌ゲノムDNA (ATCC47076株から実施例1と同じく定法により抽出した) をテンプレートに用いて配列番号: 3、及び配列番号: 4をプローブとして用いることによりPCR法で增幅し、得られたフラグメントを制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで約1.0kbの乳酸デヒドロゲナーゼ構造遺伝子 (1dhA) フラグメントを得た。上記の2つのフラグメントとプラスミドpUC18 (1dhA) フラグメントを得た。得られた2つのフラグメントとプラスミドpUC18を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントとを混じ、DNAリガーゼを用いて結合した後、大腸菌 (DH5 α 株) に形質転換することによりプラスミドpG1y1dhAを得た。

【0045】

得られたプラスミドpG1y1dhAを大腸菌W14851ip2株 (ATCC25645) および大腸菌MT-10934株に形質転換することにより乳酸生産菌W14851ip2/pG1y1dhA株およびMT-10934/pG1y1dhA株を得た。

【0046】

尚、W14851ip2株はアメリカンタイプカルチャーコレクションよりATCC2

5645として入手できる。pUC18はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手できるATCC37253から定法により抽出することにより得られる。また、MT-10934株は、先に記載したとおり、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

【0047】

実施例3（乳酸生産菌W14851ip2/pGly1dhAによる乳酸生産）
培養に使用する培地の組成を下記表3に記載する。

【0048】

【表3】

表3：培地組成

G l u c o s e	5 0	g / L
硫酸	1 0	g / L
K ₂ HPO ₄	1	g / L
NaCl	2	g / L
MgSO ₄	0. 5	g / L
CaCl ₂	0. 1	mM
DL-リボ酸	1	μg / L

(残部：水)

【0049】

前培養として三角フラスコにいれたLB Broth, Miller 培養液(Difco 244620) 25mlに乳酸生産菌W14851ip2株、およびW14851ip2/pGly1dhA株を植菌し、一晩120rpmで攪拌培養を行った後、1Lの培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に上記表3に記載の培地475gを入れたもに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度600rpm、培養の温度37°C、pH7.3(NaOHで調整)で24時間行った。培養終了後、培養液中の乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法に従って測定した。結果を表4に示す。

【0050】

【表4】

表4

W14851ip2	W14851ip2/pGly1dhA
D-乳酸蓄積量 4 g / kg 培養液	17 g / kg 培養液

【0051】

実施例4（乳酸生産菌MT-10934/pGly1dhA株による乳酸生産）
前培養として三角フラスコにいれたLB Broth, Miller 培養液(Difco 244620) 25mlに実施例2で得られた乳酸生産菌MT-10934/pGly1dhA株を植菌し、実施例1に記載の方法で培養を行った。培養終了後、乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法にしたがって測定した。結果を表5に示す。

【0052】

【表5】

表5

D-乳酸蓄積量	94 g / kg 培養液
培養液回収量	570 g
乾燥菌体重量	2.0 g
D-乳酸光学純度	99.9% e.e 以上
培養開始 50 h r 後の D-乳酸蓄積量	65.2 g / g

【0053】

上記結果において、総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわっている原因はコーンスティープリカーカー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンスティープリカーカー中の還元糖、有機酸、アミノ酸をすべて使用したとしても90%以上の変換率を達成した。

実施例5（大腸菌p f 1 B遺伝子の近傍領域のクローニング）

大腸菌MG 1655株の染色体DNAを、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) 記載の方法により調製した。また、遺伝子データバンク (E. coli GenBank) 中のMG 1655株完全長塩基配列 (accession number U00096) を基にp f 1 B遺伝子 (2,283 bp) の塩基配列 (accession number b0903) 近傍領域をクローニングするため、配列番号：5、6、7及び8に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号：6、7のプライマーは5'末端側にSph I認識部位を有している。

【0054】

前記染色体DNA 1 μg を用いて、配列番号5と配列番号6、配列番号7と配列番号8の組み合わせで、上記プライマーDNA各々100 pmol、および通常の条件でPCRを行なうことにより約1.8 kb及び、約1.3 kbのDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分離、回収した。配列番号：5と配列番号：6を用いて増幅された断片の5'末端近傍にはHind IIIサイトが存在するので、この断片をHind IIIおよびSph Iで消化した。また、配列番号：7と配列番号：8を用いて得られた断片の3'末端近傍にはPst Iサイトが存在するので、この断片をSph IおよびPst Iで両端を消化した。この消化断片2種とプラスミドpUC18 (宝酒造) のHind IIIおよびPst I消化物とをT4 DNAリガーゼで反応した後、大腸菌DH5α株を形質転換して、p f 1 B遺伝子の5'上流近傍断片及び3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpUCΔp f 1 Bと命名した。

【0055】

さらに、プラスミドpUCΔp f 1 BをSph Iで消化後、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端にした。ここにATCC37033より抽出して得られるpACYC184をHae IIで消化して得られる、クロラムフェニコール耐性領域を含む約1.3 kbのDNA断片をT4 DNA polymeraseにより平滑末端にしたフラグメントを挿入し、大腸菌DH5α株を形質転換して、クロラムフェニコール耐性領域が挿入されたプラスミドを得、このプラスミドをpUCΔp f 1 B : Cmrと命名した。

【0056】

実施例6（大腸菌MG 1655株p f 1 B遺伝子破壊株の作製）

実施例5で得られたプラスミドpUCΔp f 1 B : Cmrで大腸菌MG 1655株を形質転換し、クロラムフェニコール10 μg / ml、アンピシリン50 μg / mlを含むLB寒天プレートに塗布し、37℃で一晩培養した。得られた形質転換体をクロラムフェニ

コール $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB液体培地中で培養した。得られた培養液を希釈してクロラムフェニコール $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天培地に塗布し、これをアンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天プレートにレプリカを行い、クロラムフェニコール耐性、かつアンピシリン感受性の株を取得することで、pUCΔpf1B:CmrがMG1655株の染色体に相同組換えにより挿入されたのち、pUCΔpf1B:Cmrと染色体上の相同領域で相同組換えが起こり、pf1B遺伝子領域がクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換したと予想される候補株を複数得た。

【0057】

これらの候補株の染色体DNAを鋳型として、配列番号：9および配列番号：10を用いてPCRによりpf1B近傍領域を含む断片を増幅させ、pf1B領域がクロラムフェニコール耐性領域に置換されたサイズ（約3.0kb）に該当する断片が増幅されることを確認した。さらに、候補株の染色体DNAをpf1B遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、pf1B遺伝子が検出されない株を選抜した。以上を満足するクローンをpf1B欠失株とし、得られた株をMG1655Δpf1B株と命名した。

【0058】

実施例7（大腸菌MG1655株pf1B遺伝子破壊株による乳酸の生産）

前培養として三角フラスコにLB Broth, M111er培養液（Diffco 244620）25gを入れたものを複数用意した。これに乳酸生産菌MG1655株、MG1655Δpf1B株、およびMG1655Δpf1B株に実施例2に記載のプラスミドpG1y1dhAを定法により組み換えたMG1655Δpf1B/pG1y1dhA株の3種類の菌株を別々に植菌し、一晩、30℃、120rpmで搅拌培養を行った後、1L容の培養槽（ABLE社製培養装置BMJ-01）に表6に示す培地475gを入れたものにそれぞれ全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、搅拌速度200rpm、培養温度31℃、pH6.7（NaOHで調整）で50時間行った。培養終了後、得られた培養液中の乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法に従って測定した。結果を表7に示す。

【0.059】

【表6】

表6 培地組成

Glucose	100 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
NaCl	3.0 g/L
MgSO ₄ · 7aq	0.1 g/L
酵母エキス	0.5 g/L
カザミノ酸	5.0 g/L

（残部：水）

【0060】

【表7】

表7	MG1655	MG1655△pf1B	MG1655△pf1B /pGlyldhA
D-乳酸蓄積量	28 g/L	58 g/L	63.7 g/L

【0061】

実施例8 (MG1655△pf1B株による乳酸の生産)

前培養として三角フラスコに入れた培養液25gにMG1655株、MG1655△pf1B株、およびMG1655△pf1B /pGlyldhA株を別々に植菌し、一晩30℃、120rpmで搅拌培養を行った後、1L容培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に表8に示す培地475gを入れたものに別々に全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、搅拌速度300rpm、培養温度35℃、pH7.2(NaOHで調整)で24時間行った。培養終了後、得られた培養液中の乳酸およびピルビン酸の測定はHPLCで定法に従って測定した。結果を表9に示す。

【0062】

【表8】

表8 培地組成

ブドウ糖	10%
コーンスティープリカ (日本食品化工製)	5%
アデカノールL G 1 2 6	0.1%
(残部:水)	

【0063】

【表9】

表9

	MG1655	MG1655△pf1B	MG1655△pf1B /pGlyldhA
D-乳酸蓄積量	52g/L	95g/kg培養液	95g/kg培養液
培養液回収量	520g	560g	560g
乾燥菌体重量	2.5g/L	2.5g/L	2.5g/L
ピルビン酸	1.1g/L	1.1g/L	0.3g/L
培養時間	24時間	24時間	24時間

【0064】

上記結果において、総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわっている原因はコーンスティーブリカー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンスティーブリカー中の還元糖、有機酸、アミノ酸を全て使用したとしても90%以上の変換率を達成した。

実施例10 (大腸菌MG1655株pdh遺伝子破壊株による乳酸の生産)

配列番号：11と配列番号：12、配列番号：13と配列番号：14の組み合わせで実施例5の方法にしたがってpdhサブユニットの一つであるaceE遺伝子破壊用プラスミドを作成した。さらに実施例6に記載の方法で大腸菌MG1655株aceE遺伝子破

壊株を作成し、これをMG1655ΔaceE株とした。

【0065】

前培養として三角フラスコにいれた培養液25gに乳酸生産菌MG1655株、MG1655ΔaceE株、およびMG1655ΔaceE株に実施例2に記載のプラスミドpGly1dhAを定法により組み換えたMG1655ΔaceE/pGly1dhA株の3種類の菌株をそれぞれ植菌し、一晩30℃、120r.p.mで搅拌培養を行った後、1L容培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に表6に示す培地475gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、搅拌速度200r.p.m、培養終了度31℃、pH6.7(NaOHで調整)でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、得られた培養液中の乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法にしたがって測定した。結果を表10に示す。

【0066】

【表10】

表10	MG1655	MG1655ΔaceE	MG1655ΔaceE /pGly1dhA
D-乳酸蓄積量	45g/L	53g/L	58g/L

【0067】

実施例11(MG1655Δpf1B株による乳酸の高蓄積生産)

前培養として三角フラスコにいれた培養液25gにMG1655Δpf1B株を植菌し、一晩120r.p.mで搅拌培養を行った後、ABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に表11に示すグルコース濃度を10%～15%まで変化させた培地475gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、搅拌速度300r.p.m、培養終温度35℃、pH7.2(NaOHで調整)でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、乳酸の測定はHPLCで定法にしたがって測定した。結果を表12に示す。

【0068】

【表11】

表11 培地組成

ブドウ糖	10%、12%，15%
コーンスティープリカ (日本食品化工製)	5%
アデカノールLG126	0.1%
(残部：水)	

【0069】

【表12】

表12

グルコース濃度	10%	12%	15%
D-乳酸蓄積量	95g/kg培養液	112g/kg培養液	130g/kg培養液
培養液回収量	560g	567g	580g
乾燥菌体重量	2.5g/L	2.5g/L	2.5g/L

【0070】

総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわる原因是コーンスティープリカーナ中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンスティープリカーナ中の還元糖、有機酸、アミノ酸をすべて使用したとしても90%以上の変換率を達成し、かつ130g/Lというこれまでにない高い蓄積量を達成した。

【0071】

実施例12 (MG1655△pf1B株によるコーンスティープリカーナ添加量の検討)
前培養として三角フラスコにいれた培養液25gにMG1655△pf1B株を植菌し、一晩120rpmで攪拌培養を行った後、ABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に表13に示すコーンスティープリカーナ(CSL)濃度を1~10%まで変化させた培地475gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度300rpm、培養温度35℃、pH7.2(NaOHで調整)で24時間行った。培養終了後、乳酸の測定はHPLCで定法にしたがって測定した。結果を表14に示す。

【0072】

【表13】

表13 培地組成

ブドウ糖	10%
CSL (日本食品化工製)	1%、2.5%、5%、10%
アデカノールLG126	0.1%
(残部：水)	

【0073】

【表14】

表14

CSL	1%	2.5%	5%	10%
D-乳酸蓄積量	55g/L	90g/L	94g/L	96g/L

【0074】

1%のコーンスティープリカーナ添加区では生産速度の低下が観察されたものの24時間で55g/Lとこれまでにない生産速度である。また、使用したグルコースに対する乳酸への変換率は90%以上を維持していた。

【0075】

実施例13 (MG1655△pf1B株による通気条件による解糖速度への影響)
前培養として三角フラスコにいれた培養液25gにMG1655△pf1B株を植菌し、一晩120rpmで攪拌培養を行った後、ABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に表15に示す培地475gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気条件は表16に示す条件、培養温度35℃、pH7.2(NaOHで調整)で24時間行った。残存グルコース量はグルコースCII-テストワコー(和光純薬工業)により測定した。

【0076】

【表15】

表15 培地組成

ブドウ糖	12%
C S L (日本食品化工製)	5%
アデカノールL G 1 2 6	0.1%
(残部：水)	

【0077】

【表16】

表16

試験区	1	2	3	4
通気量(vvm)	0	0.5	0.5	0.5
攪拌速度(rpm)	200	200	400	600

【0078】

【表17】

表17

試験区	1	2	3	4
グルコース残存量 (g/L)	59.4	39.4	21.7	67.9

【0079】

この試験により通気条件が向上するに従い解糖速度が向上し、通気条件を向上させすぎると解糖速度が低下することがわかる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsui Chemicals, Inc.
<120> A Method for production of lactic acid
<130> P0002577
<160> 14

<210> 1
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ggaattcgtc gaccggctcc agttcgaagc tggt 34

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ggaattctga ctcagctaac aataaaattt tt 32

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ggaattccgg agaaagtctt atgaaaact 28

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
cccaagcttt taaaccagtt cgttcgggc 29

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>

gcacgaaagc tttgattacg 20

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ttattgcatg ctttagatttgc actgaaatcg 30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ttattgcatg cttatttact gcgtacttcg 30

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
aaggcctacg aaaagctgca g 21

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
tcacgcgagc tattatcgt cgttattatc 30

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
tccaccgtgt tgattgttgt tgctaa 26

<210> 11
<211> 29
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
tttgaattct gccactgaat agcagccag 29

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ttggatccaa cgttgagtt tctggaacc 29

<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
tttggatcc gaggtaaaag aataatggc 29

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400>
ccaccccg ccacggcagc 20

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 光学純度の高い乳酸を効率的に生産する乳酸の生産方法を提供する。

【解決手段】 ピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) 活性が野生型より低下しているか全くくなっているヘテロ乳酸発酵細菌、または、ピルベートホルメートリアーゼ (p f 1) 及びピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) の活性が野生型より低下しているか全くなくなっている大腸菌等のヘテロ乳酸発酵細菌を pH 6～8、通気条件下で培養し、得られた培養物から乳酸を回収することを特徴とする乳酸の生産方法。

【選択図】 なし

特願 2003-342222

出願人履歴情報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1997年10月 1日

名称変更

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

三井化学株式会社

2. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2003年11月 4日

住所変更

東京都港区東新橋一丁目5番2号

三井化学株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.